

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 470号	学位授与年月日	平成18年 3月15日
氏 名	深 澤 貴 子		
論文題目	Implication of B lymphocytes in endotoxin-induced hepatic injury after partial hepatectomy in rats (ラットを用いた肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝障害における B リンパ球の関与)		

博士(医学) 深 澤 貴 子

論文題目

Implication of B lymphocytes in endotoxin-induced hepatic injury after partial hepatectomy in rats

(ラットを用いた肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝傷害におけるBリンパ球の関与)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

肝切除術後に発生する全身感染症は、術後管理の進歩した現在でも肝不全につながる危険性のある重篤な合併症である。グラム陰性桿菌感染症において、エンドトキシンは肝傷害を惹起する主要な原因物質である。肝部分切除後のエンドトキシン投与により誘発される肝傷害モデルでは、エンドトキシン感受性の増強したクッパー細胞、および活性化され肝組織内に浸潤した好中球が傷害進展の中心的な役割を担うことが報告されている。網内系細胞のみならず、エンドトキシンはリンパ球系細胞にも直接作用し、Bリンパ球においては分化、増殖、遺伝子再構成や、それに引き続くサイトカイン、イムノグロブリンの産生を誘導する。しかし、リンパ球系細胞が肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝傷害モデルに及ぼす影響について調べた研究はほとんどなく、特にBリンパ球とイムノグロブリンの役割についての検討は皆無であった。本研究の目的は、肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝傷害発生に対するリンパ球系細胞とイムノグロブリンM(IgM)の関与を明らかにすることである。

〔材料ならびに方法〕

70%肝切除を施行した雄性F344ラットに対し、肝切除48時間後lipopolysaccharides (LPS) 1.5mg/kgを静脈内投与した。anti-lymphocyte serum (ALS) またはanti-immunoglobulin M μ -chainの術前投与により、それぞれリンパ球系細胞、Bリンパ球を特異的に抑制したL(-)群とB(-)群を作成した。対応するコントロール群として、whole rabbit serum、polyclonal rabbit immunoglobulin Gを投与した動物(L(+))群、B(+))群を用いた。Tリンパ球の抑制モデルとしてヌードラットを用いた(T(-)群)。各群のリンパ球分画は、手術前には末梢血のみ、手術後は末梢血、脾臓、肝臓を採取しFicoll-Isopaqueを用いた密度勾配遠心法にてリンパ球を分離した後、フローサイトメトリにて確認した。LPS投与24時間後生存率、血漿中 alanine transaminase (ALT)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、interleukin (IL)-6、IgM、血清補体価(CH50)、および肝組織所見を検討した。病理組織学的検討のため、ヘマトキシリン・エオジン染色およびIgM、補体因子C3の免疫組織化学染色を行った。

〔結果〕

- 1) LPS投与24時間後の生存率はL(+))群、B(+))群では20%、L(-)群80%、T(-)群0%、B(-)群100%であった。リンパ球系細胞またはBリンパ球を減少させたラットでは各々のコントロール群と比較して生存率の有意な改善がみられた($P<0.01$)が、Tリンパ球のみ抑制されたラットでは生存率は改善しなかった。
- 2) L(+))群、B(+))群では、LPS投与1時間後の血漿TNF- α 値、4時間後の血漿ALT、IL-6値はLPS投与前と比較して著明に上昇した。一方、L(-)群、B(-)群では血漿ALT、TNF- α 、IL-6値の上昇は有意に抑えら

れた($P<0.01$)。T(-)群でのTNF- α 、ALT値の上昇はコントロール群と差はなかった。

- 3) B(+)群の血漿IgM値はLPS投与4時間後には投与前値より有意に上昇し、CH50値は有意な下降を示した($P<0.01$)。B(-)群においては、血漿IgM値はLPS投与後も検出感度以下であり、CH50値は下降しなかった。開腹術のみ施行したラットに対するLPS投与後には、血漿IgM値の上昇、CH50値の有意な下降は認められなかった。
- 4) L(+)群、B(+)群の肝組織では、LPS投与4時間後に肝類洞の狭小化、好中球浸潤を伴う著明な壊死像を認めたが、L(-)群、B(-)群では肝組織傷害は軽減され、肝組織の構築は保たれていた。T(-)群ではコントロール群と同程度の肝傷害がみられた。B(+)群の傷害肝においてIgMおよびC3の著しい沈着がみられたが、B(-)群では肝組織へのIgMおよびC3の沈着は減少していた。

〔考察〕

L(+)群と比較して、L(-)群では生存率や血清学的データの有意な改善に加え、組織学的な肝傷害の軽減が観察されたことより、肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝傷害にリンパ球系細胞が関与している可能性が示された。さらに、B(-)群においては肝傷害が著明に抑制され、24時間生存率が100%であったのに対し、T(-)群では全てのラットが耐術不能であったことから、リンパ球系構成細胞の中ではTリンパ球よりもむしろBリンパ球が本病態の進展に促進的な役割を果たしていると考えられた。

様々な感染症に対し、Bリンパ球とnatural antibodyは最も迅速な防御機構のひとつとしてはたらくことが知られている。本研究において、肝部分切除を施行した動物に対してLPSを投与すると、開腹術のみ施行した動物へのLPS投与ではみられなかった血漿IgM値の上昇が起こることが確認できた。また、傷害肝にIgMの著しい沈着がみられたこと、Bリンパ球の抑制により血漿中および組織に沈着したIgMが減少し、それと共に血清学的、組織学的な肝傷害が著明に抑えられたことから、肝切除後にLPSに対する感受性が増したBリンパ球とこれにより産生されるIgMは防御的に作用するのではなく、逆に肝傷害発生に関与することが考えられた。

IgMは補体古典経路の主要な活性化因子であり、補体経路の活性化により接着因子の発現、好中球の遊走が惹起される。Bリンパ球の抑制により血漿中IgMの減少したB(-)群では、CH50の低下は抑制され、肝組織へのIgM沈着の減少と共にC3の沈着、好中球浸潤も顕著な減少を示した。このことから、IgMの結合により形成された免疫複合体を端緒とする古典経路を介した補体の活性化が本研究での肝傷害発生の一因である可能性が示唆された。

以上より、肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝傷害の発生にはリンパ球系構成細胞の中でBリンパ球が重要な役割を演じており、傷害の進展には補体古典経路が深く関与していると考えられた。しかし、リンパ球系細胞の*in vivo*での動態はエフェクター細胞とレギュレーター細胞の動的バランスにより変化するので、傷害に関与するBリンパ球の亜分画の決定が不可欠であり、今後の検討が必要になるものと思われる。

〔結論〕

肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝傷害にはLPS感受性の上昇したBリンパ球が関与しており、Bリンパ球より産生されるIgMが補体古典経路を介して障害を惹起していることを明らかにした。本研究におけるBリンパ球系抑制による効果は、このような病態の進展を制御するための新たな治療法の方方向性を示すものとする。

論文審査の結果の要旨

肝切除術後における全身感染症は肝不全を引き起こす危険性がある重篤な合併症である。この実験モデルとして、肝部分切除を行った実験動物にリポ多糖体(LPS)を投与することにより誘発される肝傷害が用いられている。このモデルではLPS感受性の亢進したクッパー細胞や肝組織に浸潤した好中球が肝傷害に関与していることが報告されている。申請者らはリンパ球系細胞の肝傷害への関与を検討した。この目的のため、抗リンパ球抗体、抗IgM μ 鎖抗体を術前に投与し、各々リンパ球を除去[L(-)群]、Bリンパ球を除去した[B(-)群]ラットを用いた。また、Tリンパ球を保有しないヌードラット[T(-)群]も用いた。これらのラットに70%肝切除を行い48時間後にLPSを静脈内投与した。

得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) LPS投与後24時間の生存率はコントロール群では20%、L(-)群80%、T(-)群0%、B(-)群100%であった。この結果、リンパ球特にBリンパ球が生存率に強く関与することが判明した。
- (2) コントロール群ではLPS投与後1時間後の血漿TNF- α 値、4時間後の血漿ALT、IL-6値はLPS投与前に比し、有意に上昇したが、L(-)群およびB(-)群ではこれらの上昇は抑制された。T(-)群ではコントロールと同様の上昇を示した。
- (3) コントロール群ではLPS投与後4時間で、血漿IgMの上昇とCH50値の有意な低下がみとめられたが、B(-)群ではこれらの現象を認めなかった。
- (4) コントロール群およびT(-)群の肝組織では、LPS投与4時間後に肝類洞の狭小化、好中球浸潤を伴う著明な壊死像を認めたが、L(-)群およびB(-)群では肝組織傷害は軽微であり、肝組織の構築は保たれていた。また、コントロール群の傷害肝においてはIgMおよびC3の著明な沈着が認められたが、B(-)群ではこれらの沈着は減少していた。

以上より、申請者らは肝部分切除後のLPS誘発肝傷害にはLPS感受性の上昇したBリンパ球が関与しており、LPSにより活性化したBリンパ球から産生されるIgMが補体古典経路を活性化することにより、肝傷害を惹起すると推察した。

審査委員会では、肝部分切除後のLPS誘発肝傷害にBリンパ球が関与することを初めて明らかにし、これによりこの肝傷害に対する新たな予防/治療法の可能性を示した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) この実験における2/3肝切除の妥当性について
- 2) LPSの投与ルートについて
- 3) 肝切除/LPS投与で脾臓、リンパ節のリンパ濾胞に影響はみられたか
- 4) 肝切除/LPS投与で肝のクッパー細胞は腫大したか
- 5) 肝傷害は瀰漫性、または限局的に起きたか
- 6) LPSは何処で代謝されるか
- 7) IgMの沈着している肝細胞は壊死をおこしているか
- 8) 血管にIgMの沈着を認めたか
- 9) 肝切除の補体産生に与える影響について
- 10) 肝切除/LPS投与で産生されるIgMは肝細胞特異的か

- 11) 肝切除によりB細胞がLPSに対して過敏となる機序について
- 12) 肝臓に顆粒球の浸潤は認めたか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小	出	幸	夫	
	副査	浦	野	哲	盟	副査 三 浦 克 敏